

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03751

研究課題名(和文) イネ初期胚の母性RNA分解機構の理解と種子への物質集積制御

研究課題名(英文) Understanding a mechanism of RNA transportation and turn over in early embryo in rice

研究代表者

佐藤 豊 (Sato, Yutaka)

国立遺伝学研究所・ゲノム・進化研究系・教授

研究者番号：40345872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はこれまでイネの初期胚形成機構の解析を行ってきた。この過程で、「初期胚ではRNAが極めて不安定化する現象」を発見した。動物の初期胚では母性RNAの分解とそれに続く胚性遺伝子の活性化機構に関する解析が進んでいるが、植物では現象そのものの記述もほとんどなく未開拓の分野である。本研究では、植物において初めてとなる母性RNAの分解機構を明らかにし、その植物初期発生における意義を明らかにする。さらに、種子中の胚に蓄積する有用成分等の含量制御へ、母性RNAの分解制御と胚性遺伝子の活性化機構の利用を検討することにより、植物遺伝育種科学への貢献を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、イネを用いて植物の初期発生を理解することを目的に行われた。植物の初期発生は、動物のそれに比べて理解が進んでおらず、基礎研究として生物を理解する上で重要な課題である。一方、植物の胚が含まれている種子は、人類が食糧として利用していることも多く、胚形成の理解が物質集積などに役立つ可能性も十分にある。このことから、本研究によるイネ胚の初期発生理解につながり、ひいてはイネ種子における効率的な遺伝子発現制御へと結びつくこと期待される。

研究成果の概要(英文)：I have been engaged in a research analyzing plant embryogenesis using rice as a model. During a process to analyze rice embryo development, I have noticed that some RNA molecule could be very unstable. The process of turn-over of maternal RNA after fertilization is not well characterized in plant comparing to that in animal systems. Therefore, I tackled this issue and tried to contribute to breeding science through the understanding of molecular basis of gene expression at very early stages in plant embryogenesis.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：イネ 初期胚 母性RNA

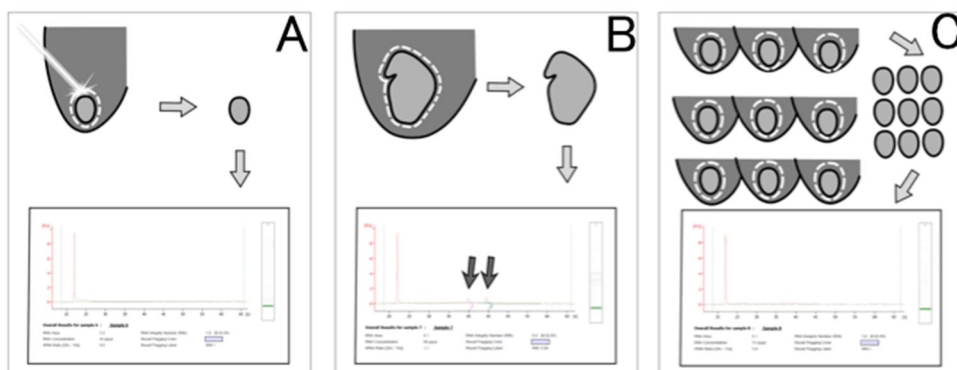
1. 研究開始当初の背景

胚形成の初期段階には RNA 分解活性が母性 RNA の発現制御に重要な役割を果たしており、この時期を過ぎると接合子由来の細胞で転写された RNA が安定的に蓄積・発現すると考えられている。このような現象は、動物や昆虫などで、母性胚性遷移(MZT: Maternal to Zygotic Transition)として知られている。動物では、胚形成のごく初期のイベントは母性因子により制御されており、胚形成のある段階で MZT により母性因子の分解と胚性遺伝子の活性化が引き起こされる。植物においては、母性 RNA の分解過程は国内外合わせてみてもほとんど研究例がなく全く未解明といえる。また、MZT を経た植物の胚性遺伝子活性化については、次世代シーケンサーによる網羅的発現解析から、真っ向から対立する二つの見解がそれぞれハイインパクトジャーナルに報告されている。一つは、シロイヌナズナの受精後初期胚では母性 RNA が優先的に蓄積し、一定期間後に母性ならびに父性由来の転写物が蓄積するという報告、二つ目は初期胚の段階で母性・父性 RNA が均等に蓄積しているという真っ向から対立する研究成果が、それぞれ 2011 年に Cell 誌 (文献 1)、2012 年に Nature 誌 (文献 2) に掲載されるなど、議論が続いている。

本研究は、植物において初めてとなる母性 RNA の分解機構を明らかにし、植物胚形成の初期のイベントを明らかにする。また、初期胚における母性 RNA の動態を理解することにより、植物の MZT の時期とメカニズムに関する議論に貢献するとともに、種子への物質集積への利用による育種分野での貢献を目指す。上述の通り、植物では MZT の時期すら議論の途上にある。これら MZT に関する研究は主に、zygotic gene activation(ZGA)に着目した研究が進められており、分解に着目した研究、すなわち、植物の受精卵に含まれる母性 RNA の初期胚発生における動態に関する知見はほとんどない。そこで、本研究では、受精後に観察される高い RNA 分解活性の実態解明、および、そのイネ発生における意義の解明に焦点を絞って研究を進める。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでイネの初期胚形成機構の解析を行ってきた。この過程で、「初期胚では RNA が極めて不安定化する現象」を発見した (図 1)。動物の初期胚では母性 RNA の分解とそれに続く胚性遺伝子の活性化機構に関する解析が進んでいるが、植物では現象そのものの記述もほとんどなく未開拓の分野である。本研究では、植物において初めてとなる母性 RNA の分解機構を明らかにし、その植物初期発生における意義を明らかにする。さらに、種子中の胚に蓄積する有用成分等の含量制御へ、母性 RNA の分解制御と胚性遺伝子の活性化機構の利用を検討することにより、植物遺伝育種科学分野への貢献を目指す。



【図 1. LMD 法によるイネ胚からの RNA の回収】A. ごく初期の胚からは RNA が回収できない。B. ある程度大きくなると RNA は回収できる。C. 小さな胚をたくさん集めて、B の胚より面積を多くしても RNA は回収できない。

3. 研究の方法

イネ受精卵および初期胚から時系列ごとに全 RNA を回収し、卵細胞に発現しておりかつ受精後に様々な速度で消失する RNA 分子種を検出することにより、植物において、母性 RNA の分解が積極的に進むことをサポートするデータの取得を行なった。具体的には、まず、Laser Micro-dissection 法による RNA の抽出を試みた。次に、マイクロピペットを用いた受精卵および受精後の接合子並びに初期胚の単離と RNA 回収条件の検討を行った。最後に、共同研究によ

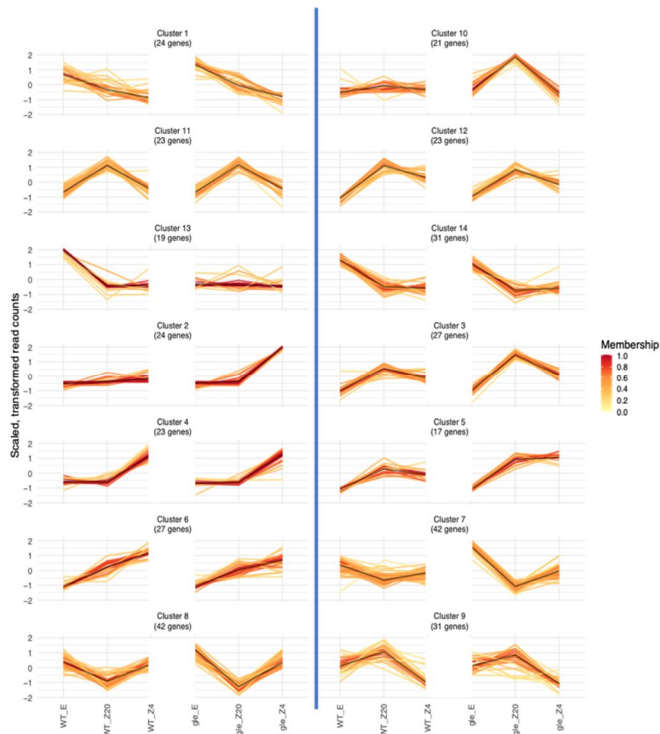
り、in vitro 受精を行い、卵細胞、in vitro 受精後 20 分、in vitro 受精後 4 時間の細胞を用意し、これらをマイクロピペット法により回収し RNA 抽出後、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析を行った。

4. 研究成果

最初に、イネ初期胚で領域特異的な発現することがすでに知られている複数の遺伝子について、ODAP、1DAP、2DAP での発現解析を in situ ハイブリダイゼーション法により行った。その結果、初期胚での発現が検出できるプローブとそうでないプローブが存在することが判明した。これらプローブの中には、初期胚における発現が RT-PCR でははっきりと確認できるものも含まれていた。このことから、イネ初期胚においては、選択的に一部の RNA は分解もしくはプロセッシングされていることが予想された。

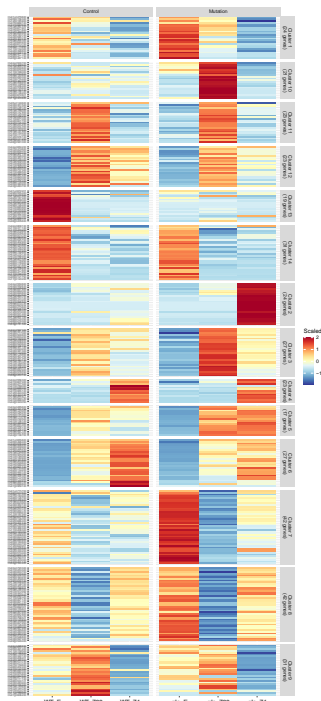
次に、LMD 法ならびに、マイクロピペットを用いた方法により、ODAP、1DAP、2DAP の胚サンプリングの条件検討を行った。その結果、LMD 法では、2DAP 以降で微量の RNA が回収できることが判明した。一方、ODAP、1DAP では、LMD 法での RNA 抽出は無可能との結論に至った。マイクロピペットによる卵細胞や受精卵の回収については、実績のある研究者から方法を伝授してもらい、ある程度サンプリングができる体制を整えた。1DAP については、LMD 法でもマイクロピペット法でも現状うまく胚を単離し RNA の抽出に至ることができていない。引き続き工夫が必要な状況にある。次に、マイクロピペットを用いた野生型初期胚（受精前の卵細胞、0HAP、12HAP、18HAP、24HAP）の胚サンプルから全 RNA の抽出を試み 0HAP、12HAP までは、ある程度の数の胚をマイクロピペットで回収できる目処が立った。また、RNA 抽出と cDNA ライブラリー作成が同時に進行できるキットの利用により、ライブラリー化についても目処が立った。一方、18HAP 以降については、今のところ胚の回収がうまくいっていない。植物胚は受精後しばらくしてから細胞壁などの合成が活発になる。このため、胚と母体が新たに合成された細胞壁により癒合し、離れなくなることがうまくいかない原因と考えている。

卵細胞および受精後のシングルセルから RNA を抽出し RNA-seq 解析を行う下準備ができたため、共同研究によりマイクロピペットと in vitro 受精を利用した方法を用い、卵細胞ならびに、受精後 20 分、受精後 4 時間のサンプルから RNA を抽出し、野生型ならびに胚形成突然変異体サンプルでの NGS 解析を行なった。その結果、各サンプルから数万遺伝子の発現を検出できる高精度 RNA 発現プロファイルの取得を行うことができた。この結果、受精後に急激に消失する RNA 分子種の存在を多数明らかにした（図 2）。



【図 2. RNA-seq データのクラスタリング解析】左列は野生型の遺伝子発現パターン、右列は glc4 突然変異体の遺伝子発現パターンを示している。ほとんどのクラスターにおいて、野生型と glc4 変異において差は見られない。一方で、cluster13, 2, 10などは、GLE4 遺伝子の卵細胞や接合子での機能を示唆するデータとなっている。

また、これらの実験を卵細胞から発現しており初期胚の頂部 基部軸形成に関わることが知られている GLE4 遺伝子の突然変異 *gle4* から RNA を回収し遺伝子発現の比較を行った (図2、図3)。その結果、*gle4* 変異において、野生型と異なる RNA の消長パターンを示すクラスターが複数見られた。これらは、GLE4 遺伝子による発現制御を受けていると考えられた。Cluster13 は *gle4* 変異型の卵細胞において、発現が消失している RNA が分類されている。このことは、*gle4* が卵細胞で機能していることを示唆している。逆に、cluster2 や cluster10 に見られるように受精後の接合子で *gle4* 特異的に発現上昇する遺伝子群も見つかった。このことは、GLE4 が受精後も機能していることを示している。上記の結果は、GLE4 が卵細胞と受精後の接合子のそれぞれで異なる機能を果たしていることを示唆している。一方、*gle4* 変異型胚で分解が抑制されるグループは見当たらなかった。このことは、GLE4 自身の母性 RNA の分解の関与を示す積極的な結果は得られなかったことを意味している。



【図3.RNA-seq データのヒートマップ解析】 cluster13, 2, 10などは、*gle4* 変異によりの卵細胞や接合子での遺伝子発現が野生型と異なる遺伝子が含まれていることが明らかになった。

【参考文献】

1. Autran et al. (2011) Cell 145, 707-719.
2. Nodin & Bartel (2012) Nature 482, 94-97.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Honda Eriko, Yew Chow-Lih, Yoshikawa Takanori, Sato Yutaka, Hibara Ken-ichiro, Itoh Jun-Ichi	4. 巻 59
2. 論文標題 LEAF LATERAL SYMMETRY1, a Member of the WUSCHEL-RELATED HOMEBOX3 Gene Family, Regulates Lateral Organ Development Differentially from Other Paralogs, NARROW LEAF2 and NARROW LEAF3 in Rice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 376 ~ 391
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcx196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yutaka Sato
2. 発表標題 Plant embryogenesis: Conservations and divergencies envisioned form rice research
3. 学会等名 16th International Symposium on Rice Functional Genomics（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤豊
2. 発表標題 NBRPイネリソースの紹介
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋(野坂)実鈴、鈴木俊哉、佐藤(志水)佐江、Nhung Ta、高橋宏和、鈴木孝征、豊田敦、中園幹生、佐藤豊
2. 発表標題 イネ胚形成におけるETT転写因子の下流で機能する転写因子群の解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤大和、深井麻央、阿南秀、佐藤豊、志水佐江、北野英己、小林裕子、小林一成、武田真、服部束穂
2. 発表標題 イネ胚乳の発生におけるプラスチドシグナリングの関与
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masako Fuji, Yuniar Devi Utami, Shigetaka Yasuda, Rena Tani, Yuichi Hongoh, Yutaka Sato, Yusuke Saijo
2. 発表標題 Damage-associated Pep peptides influence root architecture and microbiome in rice
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuniar Devi Utami, Masako Fuji, Yukiko Shimizu, Yuichi Hongoh, Yutaka Sato, Yusuke Saijo
2. 発表標題 Field Analysis for structural dynamics of rice associated microbiome
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤豊
2. 発表標題 イネ胚の極性を作り出すシグナル伝達
3. 学会等名 第38回種子生理生化学研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平岩飛鳥、相賀彩織、佐藤豊、伊藤純一
2. 発表標題 イネの葉における撥水性の制御機構と多様性の解析
3. 学会等名 日本育種学会第132回講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田均、Fabien Lombardo、秋山高、佐藤豊
2. 発表標題 イネの花器官サイズ変異体miniature floral organsの原因遺伝子の同定
3. 学会等名 日本育種学会第132回講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清水春衣、Fangping Gong、高橋宏和、志水(佐藤)佐江、佐藤豊、中園幹生
2. 発表標題 イネの側根による通気組織形成の制御機構の解明
3. 学会等名 日本育種学会第132回講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nhung Ta、佐藤(志水)佐江、高橋(野坂)実鈴、鈴木俊哉、佐藤豊
2. 発表標題 野生イネ集団(Oryza rufipogon)を用いた種子形質制御因子のGWAS 解析
3. 学会等名 日本育種学会第133回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋(野坂)実鈴、鈴木俊哉、佐藤(志水)佐江、Nhung Ta、高橋宏和、鈴木孝征、豊田敦、中園幹生、佐藤豊
2. 発表標題 SHOOTLESS/SHOOT ORGANIZATION経路の下流で機能するイネ幹細胞形成因子の探索
3. 学会等名 日本育種学会第133回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masako Fuji, Rena Tani, Shigetaka Yasuda, Yoshihiro Kobae, Takuma Ishizaki, Yasunari Fujita, Yutaka Sato, Yusuke Saijo
2. 発表標題 Damage-associated Plant Elicitor Peptides promote both plant growth and stress responses in rice
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yutaka Sato, Misuzu Nosaka-Takahashi, Toshiya Suzuki, Sae Shimizu-Sato	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 558
3. 書名 Rice Genomics, Genetics and Breeding	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関